

产气荚膜梭菌 Beta1 毒素通过 P2X7-Ca²⁺ 轴诱导巨噬细胞焦亡和铁死亡

张思雨^{1,2}, 冉林武², 曾瑾¹, 王玉炯¹

¹宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021; ²宁夏医科大学实验动物中心, 宁夏 银川 750004

摘要:目的 探索 P2X7 受体调控钙稳态失调介导的产气荚膜梭菌 Beta1 毒素毒理机制, 为 Beta1 毒素致病机制的研究提供新思路。方法 将 20 只 10 日龄 BALB/c 乳鼠随机分为对照组、rCPB1 组、PD151746 组、PD151746+rCPB1 组, 5 只/组。对照组灌胃 PBS, rCPB1 组灌胃 rCPB1, PD151746 组灌胃抑制剂 PD151746, PD151746+rCPB1 组先灌胃 PD151746, 2 h 后再灌胃 rCPB1。采用抗体芯片技术检测空肠的炎症因子的表达, 在体内水平揭示钙稳态失调在 Beta1 毒素导致机体炎性损伤中的调控作用; 进一步使用 si-RNA-P2X7 并经 rCPB1 处理 THP-1 细胞后, 分别检测细胞存活率、Ca²⁺、ROS 和 ATP 水平, 以及细胞焦亡和铁死亡的标志性检测指标, 在体外水平揭示 P2X7 受体调控钙稳态失调介导的 Beta1 毒素的毒理机制。结果 rCPB1 灌胃乳鼠后, 空肠组织中有多种炎症细胞因子表达升高 ($P < 0.05$), 而用 PD151746 治疗后, 其表达水平下降 ($P < 0.05$)。成功建立 P2X7 受体沉默细胞模型; P2X7 受体沉默后, 细胞存活率升高 ($P < 0.05$)、Ca²⁺、活性氧、三磷酸腺苷水平以及细胞焦亡和铁死亡的标志性检测指标均下降 ($P < 0.01$)。结论 P2X7 受体介导的 Beta1 毒素功能性孔形成, 能够进一步导致钙稳态失调, 从而触发活性氧过度积累, 进而诱导细胞焦亡和铁死亡共同发生。

关键词:产气荚膜梭菌 Beta1 毒素; P2X7 受体; 钙稳态失调; 细胞焦亡; 铁死亡

Clostridium perfringens Beta1 toxin induces macrophage pyroptosis and ferroptosis through the purinergic receptor P2X7-Ca²⁺ axis

ZHANG Siyu^{1,2}, RAN Linwu², ZENG Jin¹, WANG Yujiong¹

¹College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; ²Laboratory Animal Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To explore the toxic mechanism of *Clostridium perfringens* Beta1 toxin mediated by P2X7 receptor-induced calcium dyshomeostasis. **Methods** Ten-day-old BALB/c mice were randomly divided into control group, recombinant Beta1 toxin (rCPB1) group, PD151746 group, and PD151746+rCPB1 group, and all the treatment agents were administered by gavage. The changes in expressions of inflammatory factors in the jejunum of the mice were detected using antibody chip technology to explore the regulatory role of calcium dyshomeostasis in Beta1 toxin-induced inflammatory injury level. In the cell experiment, THP-1 cells were transfected with a si-RNA targeting P2X7 receptor and treated with rCPB1, and the changes in cell survival rate, levels of Ca²⁺, ROS and ATP, and expressions of pyroptosis and ferroptosis markers were determined. **Results** Oral administration of rCPB1 significantly increased the levels of inflammatory cytokines in the jejunal tissue of the neonatal mice, but their levels were significantly decreased after treatment with PD151746. In THP-1 cells, rCPB1 treatment significantly decreased cell survival and increased the levels of Ca²⁺, ROS, ATP and the expressions of pyroptosis and ferroptosis markers, and these changes were obviously attenuated by P2X7 receptor knockdown. **Conclusion** P2X7 receptor-mediated functional pore formation by Beta1 toxin can further lead to calcium dyshomeostasis, thereby triggering excessive accumulation of ROS to subsequently induce the co-occurrence of pyroptosis and ferroptosis.

Keywords: *Clostridium perfringens* Beta1 toxin; P2X7 receptor; calcium dyshomeostasis; pyroptosis; ferroptosis

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是一种专性厌氧的革兰阳性细菌,也是人和动物的肠道常在菌^[1];作为条件致病菌,研究发现该菌的每种毒素都与人和动物的各种肠道毒性和组织毒性疾病有关,对人和家畜均具有致病性^[2]。因此,研究产气荚膜梭菌所分泌的毒素的致病机制并进一步采取有效的防控措施显得十分必

要。Beta1 毒素是其主要的致死性毒素之一,能够导致坏死性肠炎。当肠道受到病原体刺激时会激活各种巨噬细胞,引发肠道炎症,造成肠损伤^[3]。即便 Beta1 毒素导致肠黏膜上皮损伤,目前的研究更倾向于这种损伤是由 Beta1 毒素导致肠固有层巨噬细胞损伤形成后引发的继发性损伤,而不是肠黏膜上皮作为 Beta1 毒素的直接靶标导致。有学者推测 Beta1 毒素作用于易感细胞 THP-1 细胞后,可能通过与 P2X7 受体(一种 ATP 受体,主要在免疫细胞和上皮细胞中表达)结合,在膜上寡聚化形成功能性孔,导致 Ca²⁺ 内流,引起细胞损伤甚至细胞死亡^[4-6]。然而,目前对 P2X7 受体介导的 Beta1 毒素成孔后引起的细胞毒性的确切机制以及会导致何种细胞死亡

收稿日期:2025-03-29

基金项目:国家自然科学基金(32360882);宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2023BCF01038)

Supported by National Natural Science Foundation of China (32360882).

作者简介:张思雨,博士,实验师,E-mail: zhangsiyu1997@163.com

通信作者:曾瑾,博士,教授,E-mail: zengjin@nxu.edu.cn;王玉炯,博士,教授,E-mail: wyj@nxu.edu.cn

方式仍有待阐明。本课题组前期研究发现, Beta1 毒素导致 THP-1 细胞成孔所引起的 Ca^{2+} 内流能够导致胞内钙稳态失调从而引发线粒体损伤, 触发活性氧(ROS)过度积累, 进而发生细胞焦亡和铁死亡^[7-9]。然而, 这种由钙稳态失调介导的 Beta1 毒素诱导细胞发生炎性死亡的毒理机制是否由 P2X7 受体调控尚未可知; 钙稳态失调在 Beta1 毒素诱导机体炎性损伤中的调控作用还需进一步验证。基于此, 本研究通过构建动物模型, 旨在体内水平揭示钙稳态失调在 Beta1 毒素导致机体炎性损伤中的调控作用; 通过构建细胞模型, 旨在体外水平揭示 P2X7 受体介导的 Beta1 毒素功能性孔形成, 能够进一步导致胞内钙稳态失调, 从而触发 ROS 过度积累, 进而诱导细胞焦亡和铁死亡共同发生的毒理机制。本研究可能为治疗 Beta1 毒素引起的疾病提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 细胞系及所需试剂

本实验所用 THP-1 细胞购自中国科学院细胞库, 重组 Beta1 毒素(rCPB1)纯化蛋白的制备如既往文献所述^[7]。其余试剂: 钙蛋白酶抑制剂 PD151746(MCE)^[10]; Lipofectamine™ iMAX 转染试剂、BODIPY™ 581/591 C11 荧光探针 (Thermo fisher); NLRP3 抗体 (Cell Signaling Technology); caspase-1 抗体 (Abcam); GSDMD、NQO1、HMOX1、GPX4、xCT 抗体 (Abmart); GAPDH、P2X7、HRP 标记二抗 (Proteintech); CCK-8 试剂盒 (Biosharp); Fluo-4 AM 荧光探针、活性氧检测试剂盒、ATP 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒 (碧云天)。

1.2 实验动物

本研究动物实验获得宁夏大学科技伦理委员会的批准 (伦理批号: NXU-2024-196), 使用许可证号: SYXK(宁)2020-0001。7 只 SPF 级 BALB/c 孕鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 常温培养于 12 h 明暗交替的动物实验室, 保证其自由饮水、摄食。由孕鼠繁育的 20 只乳鼠长至 10 日龄后进行实验。

1.3 细胞培养

使用 RPMI 1640 完全培养基培养 THP-1 细胞。计数后, 将细胞按 1×10^6 /孔的密度接种到 6 孔板中, 或按 8×10^3 /孔的密度接种到 96 孔板中, 过夜培养。

1.4 免疫印迹

将所提取的蛋白样品进行电泳后, 转印至 0.45 μ m PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h; 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗 (P2X7 1: 1000, NLRP3 1: 1000, caspase-1 1: 1000, GSDMD 1: 1000, NQO1 1: 1000, HMOX1 1: 1000, GPX4 1: 1000, xCT 1: 1000), 回收所用抗体, 洗膜; 加入二抗 (GAPDH 1: 1000), 室温孵育 2 h; 回收二抗, 洗膜, 放至暗盒曝光成像。

1.5 细胞转染

将细胞接种到相应孔板中, 按照说明书分别加入 Opti-MEM 培养基、Lipofectamine™ iMAX 转染试剂和 siRNA, 引物由生工生物合成, 引物序列 (表 1), 至少培养 24 h。

表 1 siRNA 引物序列

Tab.1 Sequences for interference of P2X7 receptor

siRNA	Sequence
siRNA-P2X7-1	F: GGAUAGCAGAGGUGAAAGATT
	R: UCUUUCACCUCUGCUAUCCTT
siRNA-P2X7-2	F: AGAUCUACUGGGACUGCAATT
	R: UUGCAGUCCAGUAGAUCUTT
siRNA-P2X7-3	F: GGAUGGACCCGACAGCAATT
	R: UUGCUCUGCGGUCCAUCCTT

1.6 细胞存活率的检测

将细胞接种到 96 孔板中, 100 μ L 培养基/孔, 每组设置 6 个重复孔。细胞转染后, 以 ID50 的剂量加入 rCPB1 进行处理^[9]。加入 10 μ L/孔 CCK-8 溶液, 2 h 后, 使用多模式微孔板检测仪检测 A_{450nm} 值并记录数据。

1.7 Ca^{2+} 的检测

将细胞接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养基。处理后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 3 次。每孔加入 Fluo-4 AM 工作液 (用 PBS 将母液稀释至 1 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。离心收集细胞, 用 PBS 洗涤后, 通过荧光显微镜检测荧光强度 (488/530 nm)。

1.8 ROS 的检测

将细胞接种到 6 孔板中, 处理后, 弃去培养基, 每孔加入 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 工作液 (终浓度为 10 mmol/L, 用 2 mL RPMI 1640 培养基稀释), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。离心收集细胞, 用 PBS 洗涤后, 通过荧光显微镜检测荧光强度 (488/530 nm)。

1.9 三磷酸腺苷 (ATP) 的检测

将细胞接种到 6 孔板中, 处理后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 3 次。收集细胞并裂解 (200 μ L 裂解液), 离心以获得上清液。按照说明书吸取 100 μ L ATP 检测工作液, 在室温下孵育 5 min。然后依次从每个样品的混合液 (上清液和 ATP 检测工作液) 中吸取 20 μ L 加入 96 孔板中, 使用多模式微孔板检测仪检测并记录数据。

1.10 丙二醛 (MDA) 的检测

将细胞接种到 6 孔板中, 处理后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 3 次。收集细胞并裂解 (150 μ L 裂解液), 离心以获得上清液。按照说明书吸取 100 μ L 样品 (上清液), 加入 200 μ L MDA 工作液, 金属浴 100 $^{\circ}$ C 煮 15 min, 冷却至室温后 1000 g 离心 10 min。然后依次吸取 200 μ L

上清到96孔板中,使用多模式微孔板检测仪检测并记录 A_{532nm} 值。

1.11 脂质过氧化反应的检测

将细胞接种到6孔板中,处理后,弃去培养基,用PBS清洗细胞3次。每孔加入2 μ L BODIPY® 581/591 C11试剂,37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。用PBS洗涤后,通过荧光显微镜检测荧光强度(581/591,488/510 nm)。

1.12 PD151746与rCPB1共处理乳鼠模型的建立

选择10日龄健康的BALB/c乳鼠20只,随机分为4组:对照组、rCPB1组、PD151746组、PD151746+rCPB1组,5只/组。对照组:用注射器吸取100 μ L PBS,连接乳鼠适用灌胃针,小心缓慢地将液体推入乳鼠食道,于保温箱中观察;rCPB1组:用注射器吸取100 μ L rCPB1 (150 μ g)进行灌胃;PD151746组:用注射器吸取100 μ L PD151746工作液(120 μ g)进行灌胃;PD151746+rCPB1组:先灌胃100 μ L抑制剂工作液,再于2 h后灌

胃100 μ L rCPB1,6 h后收样。

1.13 乳鼠空肠组织的炎症因子抗体芯片检测

取各组乳鼠的空肠组织保存于干冰中,送至广州RayBiotech生物技术有限公司检测炎症因子的表达。

1.14 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据均在至少3次独立实验后获得。

2 结果

2.1 乳鼠剖检结果

与空白对照组相比,rCPB1组乳鼠均出现不同程度的萎靡、震颤、食欲消失等症状,临床剖检发现其肠壁因充满气体扩张而非薄,肠壁黏膜出血呈现血肿状态;而PD151746+rCPB1组乳鼠出现了轻微的萎靡症状,剖检时观察发现消化道未出现明显病理变化(图1)。

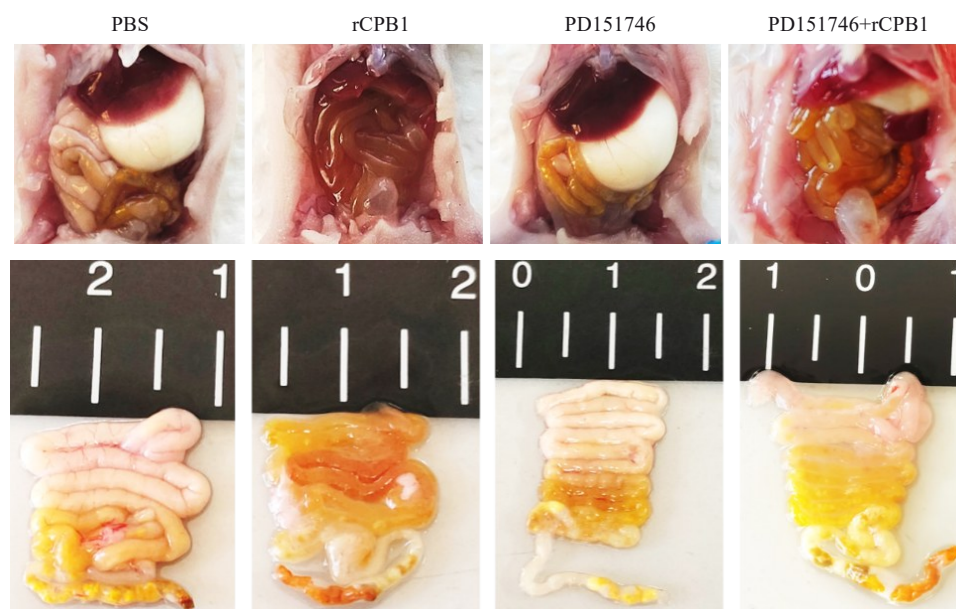


图1 乳鼠灌胃后消化道病变观察

Fig.1 Gastrointestinal lesions in suckling mice after gavage of different agents.

2.2 炎症因子的抗体芯片检测结果

与对照组相比,rCPB1组IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17、IL-21、IL-23及TNF- α 表达升高($P<0.05$,表2)。

与rCPB1组相比,PD151746+rCPB1共处理组中GM-CSF($P<0.01$)、IL-1 β ($P<0.001$)、IL-2($P<0.05$)、IL-3($P<0.01$)、IL-4($P<0.001$)、IL-5($P<0.01$)、IL-10($P<0.001$)、IL-12p70($P<0.05$)、IL-17($P<0.01$)、IL-21($P<0.05$)、IL-23($P<0.01$)、IFN- γ ($P<0.01$)表达下降(表3)。

2.3 鉴定P2X7受体的沉默效率

Western blotting结果显示,与Ctrl组相比,P2X7受

体蛋白表达上调($P<0.001$,图2)。继而设计P2X7受体蛋白的siRNA以下调其表达量,结果显示3条si-P2X7均能下调THP-1细胞中P2X7受体的蛋白表达量,其中si-P2X7-3的基因敲减效果更好($P<0.001$,图2)。后续均采用si-P2X7-3进行siRNA干扰实验。

2.4 P2X7受体对Beta1毒素诱导后细胞存活率的影响

CCK-8结果显示,相较于Ctrl组,rCPB1诱导THP-1细胞后细胞存活率下调($P<0.001$,图3);相较于rCPB1组,敲低P2X7受体与rCPB1组的细胞存活率上调($P<0.05$,图3)。

表2 空肠组织中rCPB1组与对照组差异表达的炎性因子

Tab.2 Differential expression of inflammatory factors in the jejunal tissue between Beta1 toxin group and blank control group

Protein ID	AveExp.R	AveExp.NC	logFC	P	Foldchange	Regulation	Threshold
IL-1 β	11.038471	9.952830	1.085640	0.014842	2.122318	Up	True
IL-4	10.367004	8.840474	1.526530	0.012641	2.880921	Up	True
IL-17	11.149417	9.917431	1.231985	0.011102	2.348900	Up	True
IL-21	12.077335	11.492716	0.584619	0.016853	1.499643	Up	True
IL-23	11.225443	9.751727	1.473716	0.020574	2.777363	Up	True
TNF- α	11.054078	7.873779	3.180298	0.024354	9.064948	Up	True
IL-10	11.594167	10.449359	1.144807	0.032358	2.211166	Up	True
IL-2	11.624989	8.212568	3.412420	0.039846	10.647333	Up	True
IL-9	10.103333	7.685385	2.417947	0.053630	5.344102	Up	False
IL-5	10.910604	9.888081	1.022522	0.072574	2.031467	Up	False
IL-15	8.952885	6.671663	2.281222	0.076890	4.860896	Up	False
IL-12p70	10.626989	9.659774	0.967215	0.093436	1.955062	Up	False
IL-13	8.279287	5.954063	2.325224	0.190672	5.011438	Up	False
GM-CSF	11.105001	10.092616	1.012384	0.353971	2.017243	Up	False
IL-6	10.714897	9.905783	0.809113	0.430292	1.752134	Up	False
IFN- γ	11.600352	11.329201	0.271151	0.441625	1.206770	Up	False
IL-3	10.335866	9.441554	0.894311	0.495537	1.858723	Up	False
G-CSF	6.169542	4.829909	1.339633	0.575135	2.530870	Up	False
IL-7	4.832278	4.495829	0.336449	0.857724	1.262645	Up	False
IL-1 α	10.786292	10.839428	-0.053135	0.954795	0.963839	Down	False

表3 空肠组织中PD151746+rCPB1组与rCPB1组差异表达的炎性因子

Tab.3 Differential expression of inflammatory factors in the jejunal tissue between PD151746 and Beta1 toxin co-treatment group and Beta1 toxin treatment group

Protein ID	AveExp.PR	AveExp.R	logFC	adj.P.Val	Foldchange	Regulation	Threshold
IL-1 β	9.017981	11.038472	-2.020491	0.000628	0.246474	Down	True
IL-4	7.738409	10.367005	-2.628596	0.000628	0.161701	Down	True
IL-10	9.194662	11.594168	-2.399506	0.000628	0.189529	Down	True
IFN- γ	10.175170	11.600353	-1.425182	0.001782	0.372372	Down	True
GM-CSF	6.999299	11.105001	-4.105702	0.002697	0.058085	Down	True
IL-3	5.430662	10.335866	-4.905204	0.002697	0.033372	Down	True
IL-23	9.085735	11.225443	-2.139708	0.003959	0.226926	Down	True
IL-5	9.121355	10.910604	-1.789249	0.007069	0.289323	Down	True
IL-17	9.684801	11.149417	-1.464616	0.007069	0.362332	Down	True
IL-2	7.235229	11.624989	-4.389760	0.019791	0.047704	Down	True
IL-12p70	9.127082	10.626990	-1.499907	0.021880	0.353576	Down	True
IL-21	11.530132	12.077336	-0.547204	0.040580	0.684345	Down	True
IL-7	0.713847	4.832278	-4.118431	0.054878	0.057574	Down	False
IL-6	8.623386	10.714897	-2.091512	0.069235	0.234635	Down	False
IL-9	8.054050	10.103334	-2.049284	0.131383	0.241604	Down	False
TNF- α	8.907458	11.054079	-2.146621	0.148291	0.225841	Down	False
IL-13	5.552009	8.279288	-2.727278	0.149572	0.151011	Down	False
G-CSF	3.761456	6.169543	-2.408087	0.337903	0.188406	Down	False
IL-15	7.700203	8.952886	-1.252682	0.337903	0.419667	Down	False
IL-1 α	10.168991	10.786292	-0.617301	0.511964	0.651889	Down	False

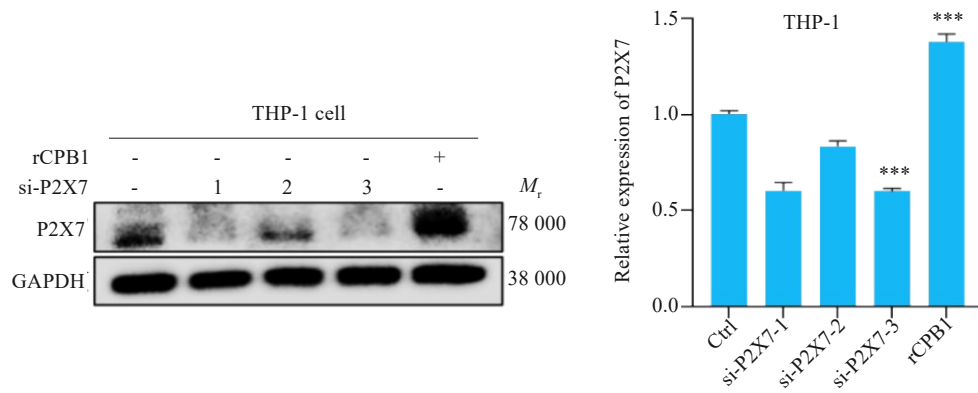


图2 THP-1细胞沉默P2X7受体后的蛋白表达

Fig.2 Decreased P2X7 receptor protein expression in THP-1 cells with P2X7 receptor knockdown.

*** $P < 0.001$ vs Ctrl ($n=3$).

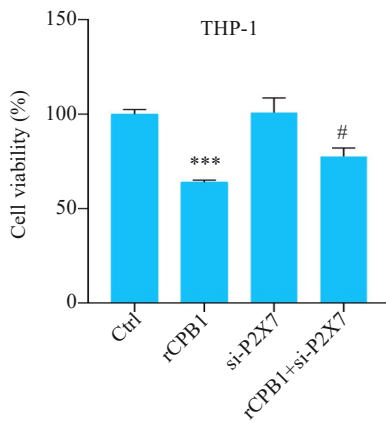


图3 THP-1细胞沉默P2X7受体后的存活率

Fig.3 P2X7 receptor knockdown increases viability in rCPB1-treated THP-1 cells. # $P < 0.05$ vs rCPB1;

*** $P < 0.001$ vs Ctrl ($n=3$).

2.5 P2X7受体对Beta1毒素诱导后Ca²⁺水平的影响

Fluo-4 AM 探针的荧光结果显示,相较于Ctrl组, rCPB1诱导THP-1细胞后Ca²⁺探针着色的阳性细胞增多,而相较于rCPB1组,敲低P2X7受体与rCPB1共处理组的阳性信号降低(图4)。

2.6 P2X7受体对Beta1毒素诱导后ROS水平的影响

DCFH-DA 探针的荧光结果显示,相较于Ctrl组, rCPB1诱导THP-1细胞后ROS探针着色的阳性细胞增

多,而相较于rCPB1组,敲低P2X7受体与rCPB1组的阳性信号降低(图5)。

2.7 P2X7受体对Beta1毒素诱导后ATP水平的影响

相较于Ctrl组, rCPB1诱导THP-1细胞后ATP水平升高($P < 0.01$,图6);相较于rCPB1组,敲低P2X7受体与rCPB1组的ATP水平降低($P < 0.01$,图6)。

2.8 P2X7受体对Beta1毒素诱导后细胞焦亡和铁死亡的影响

相较于Ctrl组, rCPB1诱导THP-1细胞后焦亡相关蛋白NLRP3($P < 0.01$)、caspase-1($P < 0.001$)、GSDMD($P < 0.001$)表达上调,铁死亡相关蛋白HMOX1($P < 0.001$)表达上调, xCT($P < 0.001$)、GPX4($P < 0.01$)、NQO1($P < 0.01$)表达下调;相较于rCPB1组,敲低P2X7受体与rCPB1组的NLRP3($P < 0.001$)、caspase-1($P < 0.001$)、GSDMD($P < 0.001$)、HMOX1($P < 0.01$)蛋白表达下调, xCT($P < 0.001$)、GPX4($P < 0.001$)、NQO1($P < 0.01$)蛋白表达上调(图7)。

相较于Ctrl组, rCPB1诱导THP-1细胞后MDA水平上调($P < 0.001$,图8A),脂质过氧化反应增强(图8B);相较于rCPB1组,敲低P2X7受体与rCPB1共处理组的MDA水平下调($P < 0.01$,图8A),脂质过氧化反应减弱(图8B)。

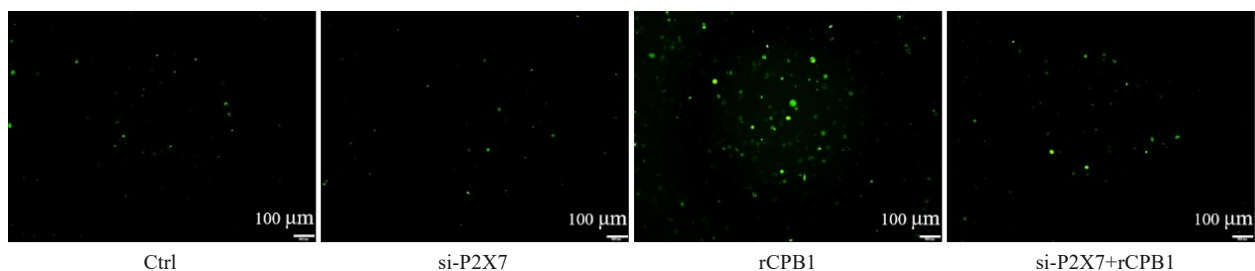


图4 THP-1细胞沉默P2X7受体后的Ca²⁺水平

Fig.4 P2X7 receptor knockdown decreases Ca²⁺ levels in rCPB1-treated THP-1 cells. Negative Ca²⁺ signal is seen in Ctrl group and si-P2X7 group, and positive Ca²⁺ signal (green) is shown in rCPB1 group and si-P2X7+rCPB1group.

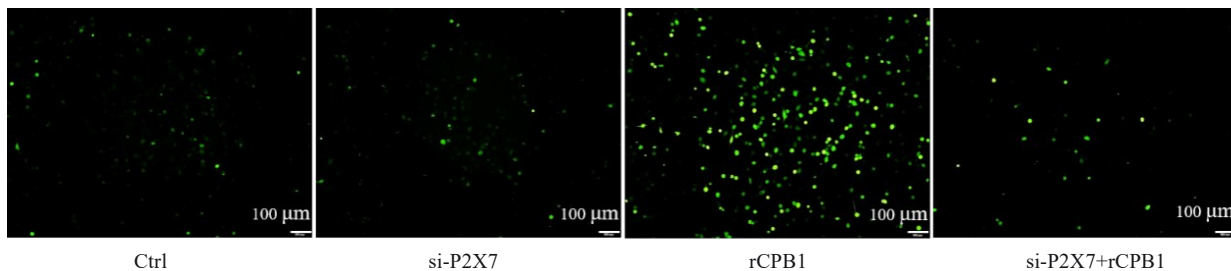


图5 THP-1细胞沉默P2X7受体后的ROS水平

Fig. 5 P2X7 receptor knockdown decreases ROS levels in rCPB1-treated THP-1 cells. ROS signal is negative in Ctrl group and si-P2X7 group and positive (green) in rCPB1 group and si-P2X7+rCPB1 group.

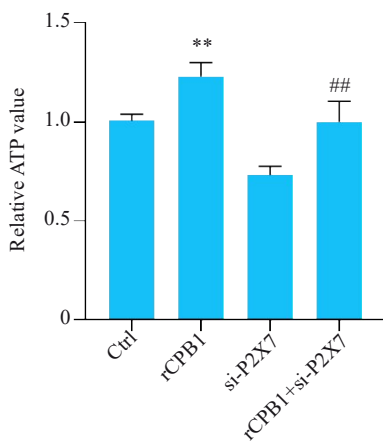


图6 THP-1细胞沉默P2X7受体后的ATP水平

Fig. 6 P2X7 receptor knockdown decreases ATP levels in rCPB1-treated THP-1 cells. ## $P < 0.01$ vs rCPB1, ** $P < 0.01$ vs Ctrl ($n=3$).

3 讨论

炎症本是一种保护性免疫反应,有利于清除感染源,但非可控的过度的炎症会带来自身免疫损伤;在重症监护室中,炎症因子风暴是导致脓毒症患者高死亡率的主要机制;而产气荚膜梭菌Beta1毒素可导致人和动物患致死的坏死性肠炎,引起肠黏膜和肠固有层的广泛损伤,甚至引发多器官损伤,最终导致动物死亡^[11]。由此推测,可能是由于Beta1毒素异常激活免疫细胞并促使其大量分泌炎症因子,引发过度炎症反应,导致坏死性肠炎,具体机制需要进一步阐明。

有学者认为高剂量的产气荚膜梭菌CPE毒素通过在膜上成孔导致Ca²⁺的大量流入和强烈的钙蛋白酶激活,会导致坏死样的细胞形态变化^[12];类似地,本课题组前期在细胞水平揭示了Beta1毒素通过导致胞内钙稳态失调从而引发巨噬细胞焦亡和铁死亡,进而导致细胞炎症水平升高的损伤机制^[9];因此,结合文献调研,本文推测这种在肠道固有层巨噬细胞中由钙稳态失调介导的炎症水平升高可能会通过级联反应造成细胞因子风暴,导致固有层发生炎症损伤,引发肠炎。

为了证实上述推测,鉴于Beta1毒素导致机体发生坏死性肠炎的天然感染途径是消化道,本研究选择灌胃

操作进行造模;鉴于Beta1毒素对胰蛋白酶敏感,胰蛋白酶可以完全抑制其活性,新生动物产生的胰蛋白酶量较低,因此容易被Beta1毒素感染^[13, 14],本研究选择乳鼠进行造模。本研究结果显示,rCPB1导致乳鼠肠道肠壁因充满气体扩张而菲薄,肠壁黏膜出血呈现血肿状态,与课题组前期研究中腹腔注射产气荚膜梭菌C59-2菌株培养上清(即天然毒素)后的成年小鼠结果^[15]一致,表明rCPB1感染动物的模型造模成功。另外,相较于对照组,单独灌胃rCPB1的乳鼠均出现明显的病理反应,灌胃PD151746和rCPB1的乳鼠的症状则明显改善,表明缓解钙稳态失调能够改善Beta1毒素导致的乳鼠肠道损伤情况,提示钙稳态失调可能是Beta1毒素致病机制的关键因素。

有研究通过细胞因子抗体芯片技术检测小鼠结肠组织中多种炎症介质水平,发现处理组炎症因子水平升高,治疗组与其相比炎症水平则降低;并据此认为处理组小鼠结肠炎症反应明显,治疗组能够有效抑制小鼠肠道炎症^[16];部分研究结论与之类似^[17-19]。鉴于Beta1毒素所引起的坏死性肠炎受损害最严重的部位主要是空肠,本研究检测了乳鼠空肠组织中炎症因子的表达水平,发现相较于空白对照组,rCPB1组中共有IL-1 β 等8个炎症细胞因子水平升高;而相较于rCPB1组,PD151746和rCPB1共处理组中共有IL-1 β 等12个炎症细胞因子水平降低,这与上述研究一致。以上表明,Beta1毒素组乳鼠空肠炎症明显,钙蛋白酶的抑制剂PD151746通过缓解胞内钙稳态失调的情况能够有效抑制乳鼠肠道炎症。这进一步证实,Beta1毒素导致机体炎症损伤的机制由钙稳态失调介导。

本研究进一步通过体外实验研究钙稳态失调介导的Beta1毒素的毒理机制。鉴于P2X7受体具有强大的促炎和细胞毒性功能,会加剧疾病进展和相关组织的损伤^[20, 21],本研究检测rCPB1作用THP-1细胞后P2X7受体的蛋白表达水平,发现其升高,而当rCPB1作用于P2X7受体沉默细胞株后,P2X7受体的蛋白表达则下降,这提示P2X7受体在Beta1毒素的致病机制中具有重要调控作用。

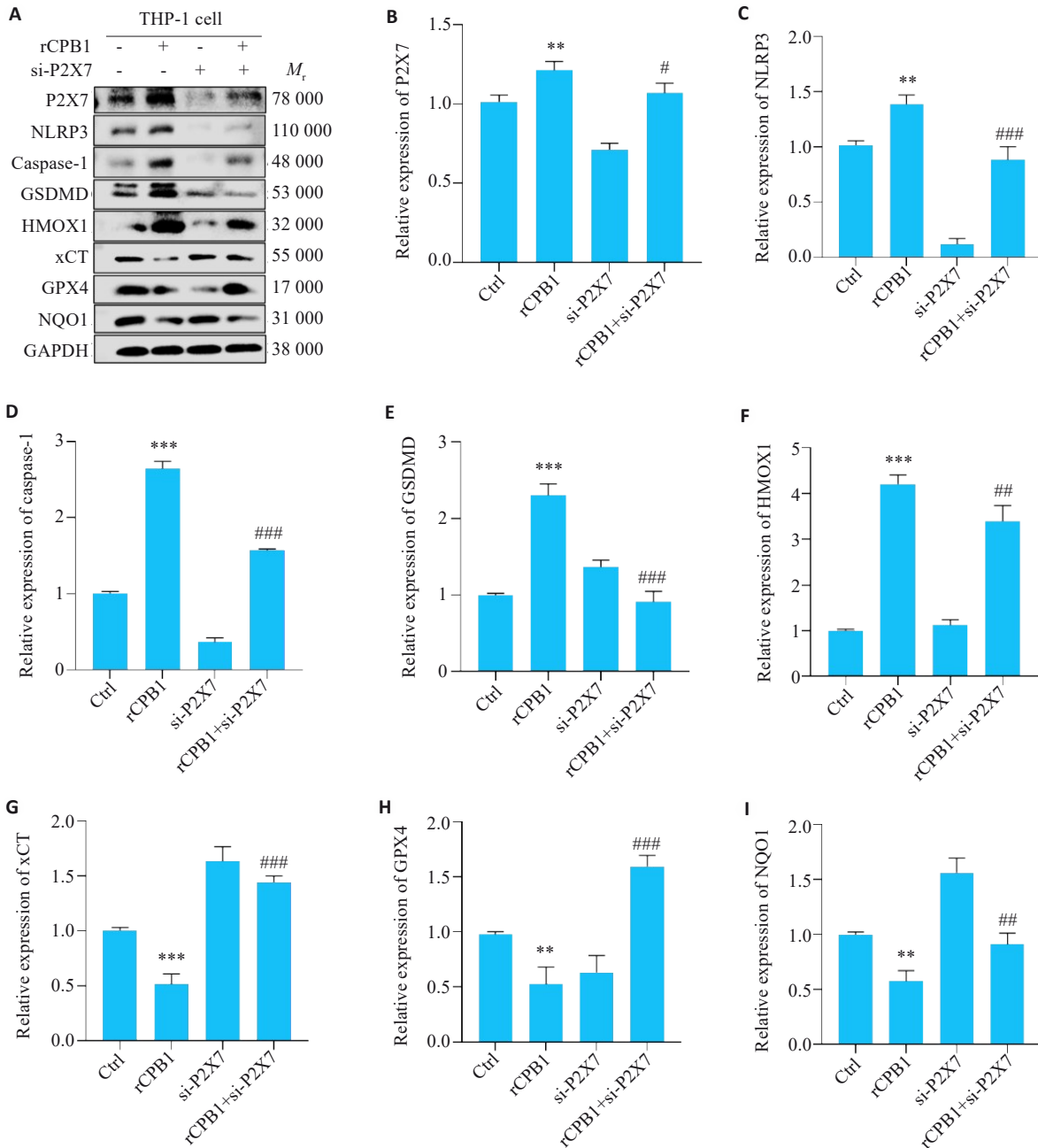


图7 THP-1细胞沉默P2X7受体后细胞焦亡、铁死亡相关蛋白的表达

Fig. 7 Expressions of pyroptosis- and ferroptosis-related proteins in THP-1 cells with rCPB1 treatments, P2X7 receptor knockdown, or both. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs rCPB1 ($n = 3$).

有研究表明 P2X7 受体的激活会导致 Ca^{2+} 内流异常, 从而导致线粒体超负荷、线粒体膜电位崩溃、线粒体通透性转换孔打开, 最终导致线粒体断裂^[22]; 有研究发现 Ca^{2+} 内流至少部分由 P2X7 受体介导^[23]。Beta1 毒素作为穿孔毒素, 能够在细胞膜上形成功能性孔, 导致 Ca^{2+} 内流^[24]; 钙离子浓度异常升高会激活钙蛋白酶, 进而引发胞内钙稳态失调。以上提示, Beta1 毒素在易感细胞膜上成孔导致的钙稳态失调, 可能由 P2X7 受体介导。为此, 本研究检测 Ca^{2+} 水平, 发现 rCPB1 诱导 THP-1 细胞后, Ca^{2+} 水平升高, 而当 rCPB1 作用于 P2X7 受体沉默细胞株后, Ca^{2+} 水平下降。有学者发现 P2X7 受体介导的

Ca^{2+} 内流, 能够进一步诱导线粒体 ROS 的产生^[25]; 本研究发现 rCPB1 作用于 P2X7 受体沉默细胞株后, ROS 水平显著下降。以上表明, P2X7 受体介导 Beta1 毒素成孔, 从而导致钙稳态失调, 会进一步诱发 ROS 的过度产生。

ROS 在细胞焦亡和铁死亡的触发中均具有重要作用。P2X7 受体被称为“细胞死亡受体”, 是一种有效的细胞死亡激活剂, 能够通过产生具有 Ca^{2+} 依赖性的 ROS, 激活 NLRP3 炎性小体^[26], 且 P2X7 受体还被证明响应于 ATP 的直接激活或病原体的攻击而促进细胞焦亡^[27]; 另有研究发现敲除 P2X7 受体, 能够显著减轻血管紧张素 II 诱导的心脏细胞铁死亡, P2X7 受体与铁死亡

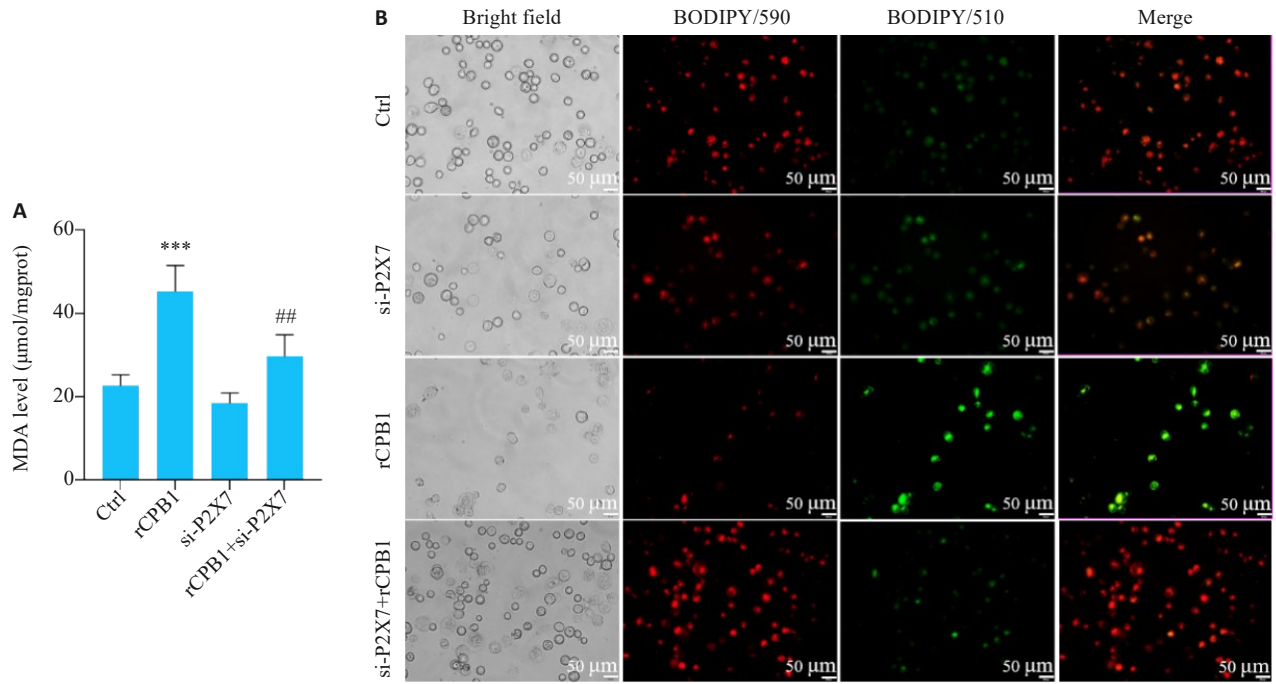


图8 THP-1细胞沉默P2X7受体后的脂质过氧化水平

Fig. 8 P2X7 receptor knockdown lowers lipid peroxidation levels in rCPB1-treated THP-1 cells. A: The levels of MDA in Ctrl group, rCPB1 group, si-P2X7 group, and si-P2X7+rCPB1 group. B: Fluorescence images in the 4 groups of cells. *** $P < 0.001$ vs Ctrl; ** $P < 0.01$ vs rCPB1 ($n=3$).

之间具有潜在的相互作用^[28, 29]。以上提示, P2X7受体介导Beta1毒素成孔所引发的胞内钙稳态失调, 可能进一步诱导细胞同时发生细胞焦亡和铁死亡。为此, 本研究通过实验发现rCPB1诱导THP-1细胞后, ATP水平, 细胞焦亡相关蛋白NLRP3、caspase-1、GSDMD的表达水平, 铁死亡相关蛋白HMOX1的表达水平, 以及MDA和脂质过氧化反应均升高, 抗氧化因子xCT、GPX4、NQO1的表达水平下降, 表明Beta1毒素诱导THP-1细胞发生了焦亡和铁死亡; 而当rCPB1作用于P2X7受体沉默细胞株后, 相关结果表明下调P2X7受体的表达水平逆转了Beta1毒素诱导的细胞焦亡和铁死亡。以上证实, P2X7受体介导Beta1毒素成孔, 从而导致胞内钙稳态失调, 进而导致ATP合成过度、ROS大量积累, 最终诱导细胞焦亡和铁死亡同时发生。

有学者发现P2X7受体可能通过促进Treg或Th17、M1或M2型细胞因子的释放, 以促进炎症微环境的形成, 参与免疫细胞分化^[30]; P2X7受体还被证明在皮肤和肠固有层的先天性和适应性Th17免疫应答的发育中发挥作用。这提示, 本研究中钙稳态失调介导Beta1毒素引发空肠组织中多个炎性细胞因子的含量改变, 可能由P2X7受体正向调控。未来研究将通过构建P2X7受体抑制剂处理的小鼠模型, 在体内水平进一步证实P2X7受体通过引起钙稳态失调在Beta1毒素致机体炎性损伤中的调控作用, 为寻找Beta1毒素的潜在治疗药物提供更为充分的理论依据。另外, 本研究尚未探讨

P2X7受体蛋白过表达对通路的潜在影响。鉴于P2X7受体自身的细胞毒性, 其表达水平可能是决定细胞命运即触发炎症还是死亡的关键因素。未来将进一步验证以下科学问题: P2X7受体过表达是否会加剧钙离子内流、ROS生成及炎性因子释放? 细胞是否通过内源性调控机制限制P2X7受体过度表达? 证实这些机制后, 不仅能完善Beta1毒素致病的分子网络, 还可为靶向治疗提供新维度(如干预P2X7受体的上游调控通路)。基于此, 未来研究将在体外构建P2X7受体过表达模型, 并结合动物实验评估表达水平与病理损伤的相关性, 同时探索联合抑制P2X7受体及其上游因子的治疗潜力。

综上所述, 本研究发现P2X7受体介导Beta1毒素在膜上成孔导致Ca²⁺的大量流入和强烈的钙蛋白酶激活, 从而引发胞内钙稳态失调, 进而导致ATP合成过度、ROS大量积累, 诱导细胞焦亡和铁死亡同时发生, 升高胞内炎性因子水平, 最终导致机体炎性损伤。鉴于P2X7受体的靶向生物制剂已经在多种炎症疾病的病理机制中发挥有效治疗作用, 本研究为P2X7受体可能成为Beta1毒素引起的疾病的潜在治疗靶点的观点提供了一定的理论基础。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 141.

- [2] Ba XL, Jin YS, Ning X, et al. *Clostridium perfringens* in the intestine: innocent bystander or serious threat [J]. *Microorganisms*, 2024, 12(8): 1610.
- [3] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 141-53.
- [4] Nagahama M, Hayashi S, Morimitsu S, et al. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36934-41.
- [5] Nagahama M, Shibutani M, Seike S, et al. The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin[J]. *Infect Immun*, 2013, 81(10): 3703-8.
- [6] Nagahama M, Seike S, Shirai H, et al. Role of P2X7 receptor in *Clostridium perfringens* beta-toxin-mediated cellular injury[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(11): 2159-67.
- [7] Zhang SY, Ma LL, Song FY, et al. Pyroptosis of macrophages induced by *Clostridium perfringens* beta-1 toxin[J]. *Toxins (Basel)*, 2023, 15(6): 366.
- [8] Zhang SY, Wang D, Ding YW, et al. Injury of macrophages induced by *Clostridium perfringens* type C exotoxins[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 3718.
- [9] Zhang SY, Wang D, Ding YW, et al. Inhibition of calpain reduces oxidative stress and attenuates pyroptosis and ferroptosis in *Clostridium perfringens* Beta-1 toxin-induced macrophages[J]. *Microbiol Res*, 2024, 289: 127916.
- [10] Liu XX, Li MH, Chen ZW, et al. Mitochondrial calpain-1 activates NLRP3 inflammasome by cleaving ATP5A1 and inducing mitochondrial ROS in CVB3-induced myocarditis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 40.
- [11] Camargo A, Ramirez JD, Kiu R, et al. Unveiling the pathogenic mechanisms of *Clostridium perfringens* toxins and virulence factors [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13(1): 2341968.
- [12] Chakrabarti G, Zhou X, McClane BA. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(8): 4260-70.
- [13] Nagahama M, Ochi S, Oda M, et al. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin[J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(2): 396-406.
- [14] Theoret JR, Uzal FA, McClane BA. Identification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin variants with differing trypsin sensitivity and *in vitro* cytotoxicity activity[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4): 1477-86.
- [15] 张思雨, 王玉炯, 曾 瑾. C型产气荚膜梭菌外毒素致小鼠肠道损伤的转录组分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(10): 3570-81.
- [16] 赵 伟, 徐冰蕊, 叶紫梦玮, 等. 基于肠道炎症反应研究降糖3号方抗糖尿病的作用机制[J]. *世界中医药*, 2024, 19(8): 1085-91.
- [17] 李柳杨, 韩小红, 钱文洁, 等. miR-23a对脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2025, 61(4): 235-8, 243.
- [18] 李明远, 张 玮, 华梦晴. 甲基巴多索龙通过抑制NLRP3炎症小体活化缓解小鼠急性肝损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(9): 1662-9.
- [19] 赵 娜, 沈梦迪, 赵 睿, 等. 血根碱通过调控Nrf2/NF-κB通路缓解小鼠溃疡性结肠炎[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(8): 1467-75.
- [20] Amaral EP, Ribeiro SCM, Lanes VR, et al. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(7): e1004188.
- [21] Fialho S, Trieu-Cuot P, Ferreira P, et al. Could P2X7 receptor be a potential target in neonatal sepsis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142(Pt A): 112969.
- [22] Di Virgilio F, Ben DD, Sarti AC, et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 15-31.
- [23] Engelhardt J, Klawonn A, Dobbstein AK, et al. Lipopolysaccharide-neutralizing peptide modulates P2X7 receptor-mediated interleukin-1β release[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2024, 8(1): 136-45.
- [24] Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins[J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(5): 212.
- [25] Amini M, Frisch J, Jost P, et al. Purinergic receptor P2X7 regulates interleukin-1α mediated inflammation in chronic kidney disease in a reactive oxygen species-dependent manner[J]. *Kidney Int*, 2025, 107(3): 457-75.
- [26] Feng HY, Wu TC, Chin J, et al. Tangzu granule alleviate neuroinflammation in diabetic peripheral neuropathy by suppressing pyroptosis through P2X7R/NLRP3 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 1): 118792.
- [27] Yang DH, He Y, Muñoz-Planillo R, et al. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock[J]. *Immunity*, 2015, 43(5): 923-32.
- [28] Kim JE, Lee DS, Wang SH, et al. P2X7 receptor augments kainic acid-induced nitrosative stress by abrogating GS-HSP25-mediated iNOS inhibition and GSH synthesis in the mouse hippocampus[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2025, 133: 103995.
- [29] Zhong X, Wang KW, Wang YH, et al. Angiotension II directly bind P2X7 receptor to induce myocardial ferroptosis and remodeling by activating human antigen R [J]. *Redox Biol*, 2024, 72: 103154.
- [30] Pandolfi JB, Ferraro AA, Sananez I, et al. ATP-induced inflammation drives tissue-resident Th17 cells in metabolically unhealthy obesity[J]. *J Immunol*, 2016, 196(8): 3287-96.

(编辑:郎 朗)